

(12) NACH DEM VERTRAG ÜBER DIE INTERNATIONALE ZUSAMMENARBEIT AUF DEM GEBIET DES
PATENTWESENS (PCT) VERÖFFENTLICHTE INTERNATIONALE ANMELDUNG

(19) Weltorganisation für geistiges Eigentum
Internationales Büro



(43) Internationales Veröffentlichungsdatum
30. Juni 2005 (30.06.2005)

PCT

(10) Internationale Veröffentlichungsnummer
WO 2005/058936 A2

- (51) Internationale Patentklassifikation: **C07K**
- (21) Internationales Aktenzeichen: PCT/EP2004/013663
- (22) Internationales Anmeldedatum:
1. Dezember 2004 (01.12.2004)
- (25) Einreichungssprache: Deutsch
- (26) Veröffentlichungssprache: Deutsch
- (30) Angaben zur Priorität:
103 59 352.7 16. Dezember 2003 (16.12.2003) DE
- (71) Anmelder (für alle Bestimmungsstaaten mit Ausnahme von
US): **MERCK PATENT GMBH** [DE/DE]; Frankfurter
Strasse 250, 64293 Darmstadt (DE).
- (72) Erfinder; und
- (75) Erfinder/Anmelder (nur für US): **FIEBIG, Helmut**
[DE/DE]; Baeckerweg 10, 21493 Schwarzenbek (DE).
NANDY, Andreas [DE/DE]; Nuesslerkamp 89, 22175
Hamburg (DE). **CROMWELL, Oliver** [GB/DE]; Am
Brook 17, 23701 Suesel-Fassendorf (DE).
- (74) Gemeinsamer Vertreter: **MERCK PATENT GMBH**;
Frankfurter Strasse 250, 64293 Darmstadt (DE).

(81) Bestimmungsstaaten (soweit nicht anders angegeben, für
jede verfügbare nationale Schutzrechtsart): AE, AG, AL,
AM, AT, AU, AZ, BA, BB, BG, BR, BW, BY, BZ, CA, CH,
CN, CO, CR, CU, CZ, DE, DK, DM, DZ, EC, EE, EG, ES,
FI, GB, GD, GE, GH, GM, HR, HU, ID, IL, IN, IS, JP, KE,
KG, KP, KR, KZ, LC, LK, LR, LS, LT, LU, LV, MA, MD,
MG, MK, MN, MW, MX, MZ, NA, NI, NO, NZ, OM, PG,
PH, PL, PT, RO, RU, SC, SD, SE, SG, SK, SL, SY, TJ, TM,
TN, TR, TT, TZ, UA, UG, US, UZ, VC, VN, YU, ZA, ZM,
ZW.

(84) Bestimmungsstaaten (soweit nicht anders angegeben, für
jede verfügbare regionale Schutzrechtsart): ARIPO (BW,
GH, GM, KE, LS, MW, MZ, NA, SD, SL, SZ, TZ, UG,
ZM, ZW), eurasisches (AM, AZ, BY, KG, KZ, MD, RU,
TJ, TM), europäisches (AT, BE, BG, CH, CY, CZ, DE, DK,
EE, ES, FI, FR, GB, GR, HU, IE, IS, IT, LT, LU, MC, NL,
PL, PT, RO, SE, SI, SK, TR), OAPI (BF, BJ, CF, CG, CI,
CM, GA, GN, GQ, GW, ML, MR, NE, SN, TD, TG).

Veröffentlicht:

— ohne internationalen Recherchenbericht und erneut zu ver-
öffentlichen nach Erhalt des Berichts

Zur Erklärung der Zweibuchstaben-Codes und der anderen Ab-
kürzungen wird auf die Erklärungen ("Guidance Notes on Co-
des and Abbreviations") am Anfang jeder regulären Ausgabe der
PCT-Gazette verwiesen.

(54) Title: DNA SEQUENCE, AND RECOMBINANT PRODUCTION OF THE GRASS POLLEN ALLERGEN LOL P 4

(54) Bezeichnung: DNA-SEQUENZ UND REKOMBINANTE HERSTELLUNG DES GRASPOLLEN-ALLERGENS LOL P 4

(57) Abstract: The invention relates to the preparation of a DNA sequence of the main grass pollen allergen Lol p 4. Also disclosed are fragments, novel combinations of partial sequences, and point mutants having a hypoallergenic effect. Said recombinant DNA molecules and the derived polypeptides, fragments, novel combinations of partial sequences, and variants can be utilized for the treatment of pollen allergic diseases. The recombinantly produced proteins can be used for *in vitro* and *in vivo* diagnosis of pollen allergies.

(57) Zusammenfassung: Die vorliegende Erfindung betrifft die Bereitstellung einer DNA-Sequenz des Graspollenhauptallergens Lol p 4. Die Erfindung schliesst auch Fragmente, Neukombinationen von Teilsequenzen und Punktmutanten mit hypoallergener Wirkung ein. Die rekombinanten DNA-Moleküle und die abgeleiteten Polypeptide, Fragmente, Neukombinationen von Teilsequenzen und Varianten können zur Therapie von pollenallergischen Krankheiten genutzt werden. Die rekombinant hergestellten Proteine können zur *In-vitro*- und *In-vivo*-Diagnostik von Pollenallergien eingesetzt werden.



WO 2005/058936 A2

DNA-Sequenz und rekombinante Herstellung des Graspollen-Allergens Lol p 4

5

Hintergrund der Erfindung

10

Die vorliegende Erfindung betrifft die Bereitstellung einer DNA-Sequenz des Graspollenhauptallergens Lol p 4. Die Erfindung schließt auch Fragmente, Neukombinationen von Teilsequenzen und Punktmutanten mit hypoallergener Wirkung ein. Die rekombinanten DNA-Moleküle und die abgeleiteten Polypeptide, Fragmente, Neukombinationen von Teilsequenzen und Varianten können zur Therapie von pollenallergischen Krankheiten genutzt werden. Die rekombinant hergestellten Proteine können zur *In-vitro*- und *In-vivo*-Diagnostik von Pollenallergien eingesetzt werden.

15

20

Allergien vom Typ 1 haben weltweite Bedeutung. Bis zu 20 % der Bevölkerung in industrialisierten Ländern leiden unter Beschwerden wie allergischer Rhinitis, Konjunktivitis oder Bronchialasthma. Diese Allergien werden durch in der Luft befindliche Allergene (Aeroallergene), die von Quellen unterschiedlicher Herkunft wie Pflanzenpollen, Milben, Katzen oder Hunden freigesetzt werden, hervorgerufen. Bis zu 40 % dieser Typ 1-Allergiker wiederum zeigen spezifische IgE-Reaktivität mit Gräserpollenallergenen (Freidhoff et al., 1986, J. Allergy Clin. Immunol. 78, 1190-2001).

25

30

Bei den Typ 1-Allergie auslösenden Substanzen handelt es sich um Proteine, Glykoproteine oder Polypeptide. Diese Allergene reagieren nach Aufnahme über die Schleimhäute mit den bei sensibilisierten Personen an der Oberfläche von Mastzellen gebundenen IgE-Molekülen. Werden zwei IgE-Moleküle durch ein Allergen miteinander vernetzt, führt dies zur Ausschüt-

35

tung von Mediatoren (z. B. Histamin, Prostaglandine) und Zytokinen durch die Effektorzelle und damit zu den entsprechenden klinischen Symptomen.

- 5 In Abhängigkeit von der relativen Häufigkeit mit der die einzelnen Allergenmoleküle mit den IgE-Antikörpern von Allergikern reagieren, wird zwischen Major- und Minorallergenen unterschieden.
- 10 Für das Weidelgras (*Lolium perenne*) wurde das Lol p 1 als ein Hauptallergen identifiziert (Freidhoff et al., 1986, J. Allergy Clin. 78:1190-1201) und seine Primärstruktur aufgeklärt (Perez et al., 1990, J. Biol. Chem. 265:16210-16215). Ein weiteres Hauptallergen ist das Lol p 2 (Freidhoff et
- 15 al., 1986, J. Allergy Clin. 78:1190-1201) dessen Primärstruktur 1993 beschrieben wurde (Ansari et al., 1989, J. Biol. Chem.: 264:11181-11185). Ein weiteres Hauptallergen des Weidelgrases ist das Lol p 5 (Mattiesen und Löwenstein 1991, Clin. Exp. Allergy 21: 297-307). Die Primärstruktur von Lol p 5 ist ebenfalls bekannt (Ong et al., 1993, Gene 134:235-240).
- 20 Das Weidelgras enthält weiterhin die Hauptallergene der Gruppen 4 (Fahlbusch et al. 1998, Clin. Exp. Allergy 28: 799-807) und 13 (Petersen et al., 2001, J. Allergy Clin. Imm. 107:856-862).
- 25 Das Lol p 4 ist ein typisches basisches Glykoprotein (Jaggi et al, 1989, Int. Arch. Allergy Appl. Immunol. 89:342-348, Jaggi et al., 1989, J. Allergy Clin. Immunol. 83:845-852) und hinsichtlich der Kreuzreaktivität mit spez. IgE-Antikörpern mit dem gut untersuchten Phl p 4, Cyn d 4 und Dac g 4 zu ver-
- 30 gleichen (Haavik et al., 1985, Int. Arch. Allergy Appl. Immunol. 78:260-268; Su et al., 1991, Clin. Exp. Allergy 21:449-455; Leduc-Brodard et al., 1996, J. Allergy Clin. Immunol. 98:1065-1072; 14-17).
- 35 Diese homologen Moleküle der *Poaceae* bilden die Allergengruppe 4, deren Moleküle eine hohe immunologische Kreuzreaktivität untereinander sowohl mit monoklonalen Mausantikörpern als auch mit humanen IgE-

Antikörpern aufweisen (Fahlbusch et al., 1993 Clin. Exp. Allergy 23:51-60; Leduc-Brodard et al., 1996, J. Allergy Clin. Immunol. 98:1065-1072; Su et al., 1996, J. Allergy Clin. Immunol. 97:210; Fahlbusch et al., 1998, Clin. Exp. Allergy 28:799-807; Gavrovic-Jankulovic et al., 2000, Invest. Allergol. Clin. Immunol. 10 (6):361-367; Stumvoll et al. 2002, Biol. Chem. 383:1383-1396; Grote et al., 2002, Biol. Chem. 383:1441-1445; Andersson und Lidholm, 2003, Int. Arch. Allergy Immunol. 130:87-107; Mari, 2003, Clin. Exp. Allergy, 33 (1):43-51).

Im Gegensatz zu den obengenannten Hauptallergenen Lol p 1, Lol p 2, Lol p 5 von *Lolium perenne* ist die Primärstruktur von Lol p 4 noch nicht aufgeklärt.

Von dem Gruppe-4 Allergen aus *Dactylus glomerata* sind bisher lediglich Peptide durch enzymatischen Abbau gewonnen und sequenziert worden: DIYNYMEPYVSK (SEQ ID NO 7), VDPTDYFGNEQ (SEQ ID NO 8), ARTAWVDSGAQLGELSY (SEQ ID NO 9) und GVLFNIQYVNYWFAP (SEQ ID NO 10, Leduc-Brodard et al., 1996, J. Allergy Clin. Immunol. 98: 1065-1072).

Auch vom Gruppe-4 Allergen des subtropischen Bermuda-Grases (*Cynodon dactylon*) sind durch Proteolyse Peptide erhalten und sequenziert worden:

KTVKPLYIITP (SEQ ID NO 11), KQVERDFLTSLTKDIPQLYLKS (SEQ ID NO 12), TVKPLYIITPITAAMI (SEQ ID NO 13), LRKYGTAADNVIDAKVVDAAQGRLL (SEQ ID NO 14), KWQTVAPALPDPNM (SEQ ID NO 15), VTWIESVPYIPMGDK (SEQ ID NO 16), GTVRDLLXRTSNIKAFGKY (SEQ ID NO 17), TSNIKAFGKYKSDYVLEPIPKKS (SEQ ID NO 18),

YRDLDLGVNQVVG (SEQ ID NO 19),
SATPPTHRSGVLFNI (SEQ ID NO 20),
und AAAALPTQVTRDIYAFMTPYVSKNPRQAYVNYRDLN (SEQ ID NO 21,
Liaw et al., 2001, Biochem. Biophys. Research Communication 280: 738-
743).

Für *Lolium perenne* wurden für das basische Gruppe-4 Allergen Peptid-
fragmente mit den folgenden Sequenzen beschrieben: FLEPVLGLIFPAGV
(SEQ ID NO 22) und GLIEFPAGV (SEQ ID NO 23, Jaggi et al., 1989, Int.
Arch. Allergy Appl. Immunol. 89: 342-348).

Diese beschriebenen Peptidsequenzen für *Lolium perenne* und andere
Gruppe-4 Allergene haben jedoch bisher nicht zur Aufklärung der Primär-
struktur des Lol p 4 Allergens geführt.

Als erste Sequenz eines Allergens der Gruppe 4 wurde von den Erfindern
der vorliegenden Patentanmeldung die noch unveröffentlichte Sequenz des
Phl p 4 aus *Phleum pratense* aufgeklärt und in der internationalen Anmel-
dung WO 04/000881 beschrieben.

Die der vorliegenden Erfindung zugrunde liegende Aufgabe bestand daher
in der Bereitstellung einer DNA-Sequenz des Lol p 4-Gens, kodierend für
ein Allergen mit den immunologischen Eigenschaften des Lol p 4, sowie ei-
ner entsprechenden rekombinanten DNA, auf deren Grundlage das Aller-
gen als Protein exprimiert und einer pharmakologisch bedeutsamen Ver-
wertung als solches oder in veränderter Form zugänglich gemacht werden
kann. Die Sequenz des Phl p 4 war Ausgangspunkt für die vorliegende Er-
findung.

Verzeichnis der erfindungsgemäßen Sequenzen

- 5 - DNA-Sequenz aus dem Lol p 4-Gen (SEQ ID NO 1).
 - Aus der DNA-Sequenz gemäß SEQ ID NO 1 abgeleitete Protein-Sequenz (SEQ ID NO 2).
 - DNA-Sequenz (SEQ ID NO 3), zusammengesetzt aus den Nukleotiden 1-200 des Phl p 4 (gemäß SEQ ID NO 5), 201-1472 des Lol p 4 (gemäß SEQ ID NO 1) sowie 1473-1503 des Phl p 4 (gemäß SEQ ID NO 5).
10 - Proteinsequenz (SEQ ID NO 4), zusammengesetzt aus den Aminosäuren 1-67 des Phl p 4 (gemäß SEQ ID NO 6), 68-490 des Lol p 4 (gemäß SEQ ID NO 2) sowie 491-500 des Phl p 4 (gemäß SEQ ID NO 6) mit den Eigenschaften, insbesondere immunologischen Eigenschaften des Lol p 4, kodiert von der DNA-Sequenz gemäß SEQ ID NO 3.
15 - DNA-Sequenz des Phl p 4 (SEQ ID NO 5), gemäß SEQ ID NO 5 aus der WO 04/000881.
 - Proteinsequenz des Phl p 4 (SEQ ID NO 6), gemäß SEQ ID NO 6 aus der
20 WO 04/000881.

Beschreibung der Erfindung

- 25 Mit der vorliegenden Erfindung wird nun erstmals eine DNA-Sequenz des Graspollenhauptallergens Lol p 4 bereit gestellt (SEQ ID NO 1) die für ein Allergen mit den immunologischen Eigenschaften des Lol p 4 kodiert.
30 Gegenstand der vorliegenden Erfindung ist daher ein DNA-Molekül kodierend für ein Allergen mit den Eigenschaften des Lol p 4, entsprechend einer Nukleotidsequenz gemäß SEQ ID NO 1.
 Weiterhin ist Gegenstand der Erfindung ein DNA-Molekül kodierend für ein
35 Allergen mit den Eigenschaften des Lol p 4, entsprechend einer Nukleotidsequenz gemäß SEQ ID NO 3, zusammengesetzt aus den Nukleotiden 1-

201 des Phl p 4 (gemäß SEQ ID NO 5), 202-1470 des Lol p 4 (SEQ ID NO 1) sowie 1471-1500 des Phl p 4.

5 Die Erfindung betrifft weiterhin zu den erfindungsgemäßen DNA-Sequenzen homologe Sequenzen bzw. entsprechende DNA-Moleküle von Gruppe-4-Allergenen aus anderen *Poaceae* wie beispielsweise *Dactylis glomerata*, *Poa pratensis*, *Cynodon dactylon*, *Holcus lanatus*, *Secale cereale*, *Triticum aestivum* und *Hordeum vulgare*, die aufgrund der bestehenden
10 Sequenzhomologie mit den erfindungsgemäßen DNA-Sequenzen unter stringenten Bedingungen hybridisieren, bzw. bezüglich Lol p 4 eine immunologische Kreuzreaktivität aufweisen.

15 Die Erfindung schließt dabei auch Fragmente, Neukombinationen von Teilsequenzen und Punktmutanten mit hypoallergener Wirkung ein.

Gegenstand der Erfindung sind daher weiterhin entsprechende Teilsequenzen, einer Kombination von Teilsequenzen bzw. Austausch-, Eliminierungs- oder Additionsmutanten, welche für ein immunmodulatorisches, T-Zell-reaktives Fragment eines Gruppe-4-Allergens der *Poaceae* kodieren.
20

25 Mit der Kenntnis der DNA-Sequenz der natürlich vorkommenden Allergene ist es nun möglich, diese Allergene als rekombinante Proteine herzustellen, die in der Diagnostik und Therapie von allergischen Erkrankungen Verwendung finden können (Scheiner and Kraft, 1995, Allergy 50: 384-391).

30 Ein klassischer Ansatz zur wirksamen therapeutischen Behandlung von Allergien stellt die Spezifische Immuntherapie oder Hyposensibilisierung dar (Fiebig, 1995, Allergo J. 4 (6): 336-339, Bousquet et al., 1998, J. Allergy Clin. Immunol. 102(4): 558-562). Dabei werden dem Patienten natürliche Allergenextrakte in steigenden Dosen subkutan injiziert. Allerdings besteht
35 bei dieser Methode die Gefahr von allergischen Reaktionen oder sogar ei-

nes anaphylaktischen Schocks. Um diese Risiken zu minimieren, werden innovative Präparate in Form von Allergoiden eingesetzt. Dabei handelt es sich um chemisch modifizierte Allergenextrakte, die deutlich reduzierte IgE-Reaktivität, jedoch identische T-Zell-Reaktivität im Vergleich zum nicht behandelten Extrakt aufweisen (Fiebig, 1995, Allergo J. 4 (7): 377-382).

Eine noch weitergehende Therapieoptimierung wäre mit rekombinant hergestellten Allergenen möglich. Definierte, ggfs. auf die individuellen Sensibilisierungsmuster der Patienten abgestimmte Cocktails von hochreinen, rekombinant hergestellten Allergenen könnten Extrakte aus natürlichen Allergenquellen ablösen, da diese außer den verschiedenen Allergenen eine größere Zahl von immunogenen, aber nicht allergenen Begleitproteinen enthalten.

Realistische Perspektiven, die zu einer sicheren Hyposensibilisierung mit Expressionsprodukten führen können, bieten gezielt mutierte rekombinante Allergene, bei denen IgE-Epitope spezifisch deletiert werden, ohne die für die Therapie essentiellen T-Zell Epitope zu beeinträchtigen (Schramm et al., 1999, J. Immunol. 162: 2406-2414).

Eine weitere Möglichkeit zur therapeutischen Beeinflussung des gestörten TH-Zell-Gleichgewichtes bei Allergikern ist die immuntherapeutische DNA-Vakzinierung. Dabei handelt es sich um eine Behandlung mit expressionsfähiger DNA, die für die relevanten Allergene kodiert. Erste experimentelle Belege für die allergenspezifische Beeinflussung der Immunantwort konnte an Nagern durch Injektion von Allergen-kodierender DNA erbracht werden (Hsu et al., 1996, Nature Medicine 2 (5): 540-544).

Gegenstand der vorliegenden Erfindung ist daher auch ein vor- oder nachstehend beschriebenes DNA-Molekül bzw. ein entsprechender rekombinanter Expressionsvektor als Arzneimittel.

Die entsprechenden rekombinant hergestellten Proteine können zur Therapie sowie zur *in vitro*- und *in vivo*-Diagnostik von Pollenallergien eingesetzt werden.

5 Zur Herstellung des rekombinanten Allergens wird die klonierte Nukleinsäure in einen Expressionsvektor ligiert und dieses Konstrukt in einem geeigneten Wirtsorganismus exprimiert. Nach biochemischer Reinigung steht dieses rekombinante Allergen zur Detektion von IgE-Antikörpern in etablierten Verfahren zur Verfügung.

10 Gegenstand der vorliegenden Erfindung ist daher weiterhin ein rekombinanter Expressionsvektor, enthaltend ein vor- oder nachstehend beschriebenes DNA-Molekül, funktionell verbunden mit einer Expressionskontrollsequenz und ein Wirtsorganismus, transformiert mit besagtem DNA-Molekül oder besagtem Expressionsvektor.

20 Ebenfalls erfindungsgegenständlich ist die Verwendung mindestens eines zuvor beschriebenen DNA-Moleküls oder mindestens eines zuvor beschriebenen Expressionsvektors zur Herstellung eines Arzneimittels zur immuntherapeutischen DNA-Vakzinierung von Patienten mit Allergien, an deren Auslösung Gruppe-4-Allergene der *Poaceae*, insbesondere Lol p 4, beteiligt sind und/oder zur Prävention solcher Allergien.

25 Wie bereits ausgeführt kann die Erfindung als eine essentielle Komponente in einem rekombinanten allergen- oder nukleinsäurehaltigen Präparat zur spezifischen Immuntherapie angewendet werden. Hierbei bieten sich mehrere Möglichkeiten. Zum einen kann das in der Primärstruktur unveränderte Protein Bestandteil des Präparates sein. Zum anderen kann durch gezielte Deletion von IgE-Epitopen des Gesamtmoleküls oder der Herstellung von einzelnen Fragmenten, die für T-Zell Epitope kodieren, erfindungsgemäß eine hypoallergene (allergoide) Form zur Therapie verwendet werden, um
30 unerwünschte Nebenwirkungen zu vermeiden. Schließlich wird durch die Nukleinsäure an sich, wenn sie mit einem eukaryontischen Expressions-
35

vektor ligiert wird, ein Präparat geschaffen, das direkt appliziert den allergischen Immunzustand im therapeutischen Sinne verändert.

5 Desweiteren handelt es sich bei der vorliegenden Erfindung um die von einem oder mehreren der zuvor beschriebenen DNA-Moleküle kodierten Polypeptide, vorzugsweise in ihrer Eigenschaft als Arzneimittel.
Insbesondere handelt es sich bei den Polypeptiden um ein Protein entsprechend einer Aminosäuresequenz gemäß SEQ ID NO 2 bzw. eines Proteins, welches diese Aminosäuresequenz oder einen Teil dieser Sequenz
10 enthält, mit den Eigenschaften, insbesondere immunologischen Eigenschaften des Lol p 4 sowie um ein Protein entsprechend einer Aminosäuresequenz gemäß SEQ ID NO 4 mit den Eigenschaften, insbesondere immunologischen Eigenschaften des Lol p 4.
15

Die Erfindung betrifft demgemäß auch ein Verfahren zur Herstellung solcher Polypeptide durch Kultivieren eines Wirtsorganismus und Gewinnung des entsprechenden Polypeptides aus der Kultur.
20

Ebenfalls erfindungsgegenständlich ist die Verwendung mindestens eines zuvor beschriebenen Polypeptides bzw. Proteins zur Herstellung eines Arzneimittels zur Diagnose und/oder Behandlung von Allergien, an deren
25 Auslösung Gruppe-4-Allergene der *Poaceae*, insbesondere Lol p 4, beteiligt sind sowie zur Prävention solcher Allergien.

30 Bei der Ermittlung der Protein- und DNA-Sequenz des Lol p 4 wurde wie folgt vorgegangen:

Die erfindungsgemäße Lol p 4-DNA-Sequenz gemäß SEQ ID NO 1 wurde durch PCR mit spezifischen Primern (Tab. 1), die von der Phl p 4 Sequenz, gemäß SEQ ID NO 5 wie in der WO 04/000881 beschrieben, abgeleitet
35 wurden, amplifiziert, kloniert und sequenziert. Insgesamt wurden 7 Klone

analysiert. Die Analyse der Klone ergab eine einheitliche Sequenz. Drei Lol p 4-DNA-Sequenzen wurden durch PCR mit den Primern #87 und #83 erhalten. Die mit diesen Primern amplifizierte Lol p 4-DNA-Sequenz kodiert für die korrespondierenden Aminosäuren 68-401, bezogen auf die Nummerierung des reifen Phl p 4 gemäß SEQ ID NO 6. Zwei weitere Klone wurden durch PCR mit den Primern #87 und #189 erhalten. Die mit diesen Primern amplifizierte Lol p 4-DNA-Sequenz kodiert für die korrespondierenden Aminosäuren 68-490 (Nummerierung entsprechend Phl p 4-Sequenz). Zwei Klone wurden durch PCR mit den Primern #87 und #131 erhalten. Die amplifizierte Lol p 4-DNA-Sequenz kodiert ebenfalls für die korrespondierenden Aminosäuren 68-490 (Nummerierung entsprechend Phl p 4-Sequenz). Die Primer #131 und #189 entsprechen den Codons für die letzten 10 Aminosäuren des Phl p 4 Proteins und überspannen das Stoppcodon.

Die erfindungsgemäße DNA-Sequenz gemäß SEQ ID NO 3 wurde nach an sich bekannten Methoden erhalten (PCR-Technik mit überlappenden Primern).

Zur Herstellung der rekombinanten erfindungsgemäßen Allergene wurden die DNA-Sequenzen gemäß SEQ ID NO 1 bzw. 3 in Expressionsvektoren (z.B. pProEx, pSE 380) eingebaut. Für die aus der Proteinsequenzierung bekannten N-terminalen Aminosäuren wurden *E. coli* optimierte Codons verwendet.

Nach der Transformation in *E. coli*, der Expression und der Reinigung der rekombinanten erfindungsgemäßen Allergene durch verschiedene Trenntechniken wurde die erhaltenen Proteine einem Refoldingprozess unterworfen.

Beide Allergene können zur hochspezifischen Diagnostik von Graspollenallergien eingesetzt werden. Diese Diagnostik kann *in vitro* durch die Detektion von spezifischen Antikörpern (IgE, IgG1 - 4, IgA) und die Reaktion mit

IgE-beladenen Effektorzellen (z. B. Basophile aus dem Blut) oder *in vivo* durch Hauttest-Reaktionen und Provokation am Reaktionsorgan erfolgen.

5 Die Reaktion der erfindungsgemäßen Allergene mit T-Lymphozyten von Graspollenallergikern können durch die allergenspezifische Stimulierung der T-Lymphozyten zur Proliferation und Zytokinsynthese sowohl mit T-Zellen in frisch präparierten Blutlymphozyten als auch an etablierten nLol p 4-reaktiven T-Zell-Linien und -Klonen nachgewiesen werden.

10 Durch ortsgerichtete Mutagenese wurden die für die Cysteine kodierenden Triplets so verändert, dass sie für andere Aminosäuren, bevorzugt Serin, kodieren. Es wurden sowohl Varianten hergestellt, bei denen einzelne Cysteine ausgetauscht wurden, als auch solche, bei denen verschiedene 15 Kombinationen von 2 Cysteinresten bzw. alle Cysteine verändert wurden. Die exprimierten Proteine dieser Cysteinpunktmutanten weisen eine stark reduzierte bzw. fehlende Reaktivität mit IgE-Antikörpern von Allergikern auf, reagieren jedoch mit den T-Lymphozythen dieser Patienten.

20 Gegenstand der vorliegenden Erfindung ist daher weiterhin ein vor- oder nachstehend beschriebenes DNA-Molekül, bei dem durch ortsgerichtete Mutagenese einer, mehrere oder alle Cystein-Reste des entsprechenden Polypeptids gegen eine andere Aminosäure ausgetauscht wurden. 25

Die immunmodulatorische Aktivität von hypoallergenen Fragmenten, die Polypeptiden mit T-Zell-Epitopen entsprechen, sowie die der hypoallergenen Punktmutanten (z.B. Cystein-Austausche) kann durch ihre Reaktion mit T-Zellen von Graspollenallergikern nachgewiesen werden. 30

Solche hypoallergenen Fragmente bzw. Punktmutanten der Cysteine können als Präparate zur Hyposensibilisierung von Allergikern eingesetzt werden, da sie mit gleicher Effektivität mit den T-Zellen reagieren, jedoch auf- 35

grund der verminderten oder ganz fehlenden IgE-Reaktivität zu geringeren IgE-vermittelten Nebenwirkungen führen.

5 Werden die für die erfindungsgemäßen hypoallergenischen Allergen-Varianten kodierenden Nukleinsäuren oder die unveränderten erfindungsgemäßen DNA-Moleküle mit einem humanen Expressionsvektor ligiert, können diese Konstrukte ebenfalls als Präparate für eine Immuntherapie (DNA-

10 Schließlich sind Gegenstand der vorliegenden Erfindung pharmazeutische Zubereitungen, enthaltend mindestens ein zuvor beschriebenes DNA-Molekül oder mindestens einen zuvor beschriebenen Expressionsvektor und gegebenenfalls weitere Wirk- und/oder Hilfsstoffe zur immuntherapeu-

15 tischen DNA-Vakzinierung von Patienten mit Allergien, an deren Auslösung Gruppe-4-Allergene der *Poaceae*, insbesondere Lol p 4, beteiligt sind und/oder zur Prävention solcher Allergien.

20 Eine weitere Gruppe von erfindungsgemäßen pharmazeutischen Zubereitungen enthält anstelle der DNA mindestens ein zuvor beschriebenes Polypeptid und eignet sich zur Diagnose und/oder Behandlung besagter Allergien.

25 Pharmazeutische Zubereitungen im Sinne der vorliegenden Erfindung enthaltend als Wirkstoffe ein erfindungsgemäßes Polypeptid oder einen Expressionsvektor und/oder deren jeweilige pharmazeutisch verwendbaren

30 Derivate, einschließlich deren Mischungen in allen Verhältnissen. Hierbei können die erfindungsgemäßen Wirkstoffe zusammen mit mindestens einem festen, flüssigen und/oder halbflüssigen Träger- oder Hilfsstoff und gegebenenfalls in Kombination mit einem oder mehreren weiteren Wirkstoffen in eine geeignete Dosierungsform gebracht werden.

35 Als Hilfsstoffe sind immunstimulierende DNA oder Oligonukleotide mit CpG-Motiven besonders geeignet.

5 Diese Zubereitungen können als Therapeutika oder Diagnostika in der Human- oder Veterinärmedizin verwendet werden. Als Trägerstoffe kommen organische oder anorganische Substanzen in Frage, die sich für die parenterale Applikation eignen und die Wirkung des erfindungsgemäßen Wirkstoffs nicht negativ beeinflussen. Zur parenteralen Anwendung dienen insbesondere Lösungen, vorzugsweise ölige oder wässrige Lösungen, ferner Suspensionen, Emulsionen oder Implantate. Der erfindungsgemäße Wirkstoff kann auch lyophilisiert und die erhaltenen Lyophilisate z.B. zur Herstellung von Injektionspräparaten verwendet werden. Die angegebenen Zubereitungen können sterilisiert sein und/oder Hilfsstoffe wie Konservierungs-, Stabilisierungs- und/oder Netzmittel, Emulgatoren, Salze zur Beeinflussung des osmotischen Druckes, Puffersubstanzen und/oder mehrere weitere Wirkstoffe enthalten.

10 Weiterhin können durch entsprechende Formulierung des erfindungsgemäßen Wirkstoffs Depotpräparate - zum Beispiel durch Adsorption an Aluminiumhydroxid - erhalten werden.

20 Die Erfindung dient somit auch zur Verbesserung der *in vitro* Diagnostik im Rahmen einer Allergen-Komponenten auflösenden Identifizierung des patientenspezifischen Sensibilisierungsspektrums. Die Erfindung dient ebenfalls zur Herstellung von deutlich verbesserten Präparaten zur spezifischen Immuntherapie von Gräserpollenallergien.

Tabelle 1 Verwendete Primer

30 Primer nummer	SEQ ID NO	Sequenz
#83	24	GGCTCCCGGGGCGAACCAGTAG
#87	25	ACCAACGCCTCCCACATCCAGTC
35 #131	26	GATAAGCTTGAATTCTGATTAGTACTTTTTGATCAGC GGCGGGATGCTC
#189	27	GATAAGCTTCTCGAGTGATTAGTACTTTTTGATCAGC

- 14 -

		GGCGGGATGCTC
--	--	--------------

5

10

15

20

25

30

35

Patentansprüche

- 5 1. Ein DNA-Molekül kodierend für ein Allergen mit den Eigenschaften des Lol p 4, entsprechend einer Nukleotidsequenz, ausgewählt aus einer der Sequenzen gemäß SEQ ID NO 1 und 3.
- 10 2. Ein DNA-Molekül, das mit einem DNA-Molekül gemäß Anspruch 1 unter stringenten Bedingungen hybridisiert und von DNA-Sequenzen von *Poaceae*-Spezies abstammt.
- 15 3. Ein DNA-Molekül, kodierend für ein Polypeptid, welches mit dem Majorallergen Lol p 4 aus *Lolium perenne* immunologisch kreuzreagiert, und von DNA-Sequenzen von *Poaceae*-Spezies abstammt.
- 20 4. Ein DNA-Molekül, entsprechend einer Teilsequenz oder einer Kombination von Teilsequenzen nach einem oder mehreren der Ansprüche 1 bis 3, welches für ein immunmodulatorisches, T-Zell-reaktives Fragment eines Gruppe-4-*Poaceae*-Allergens kodiert.
- 25 5. Ein DNA-Molekül, entsprechend einer Nukleotidsequenz gemäß einem oder mehreren der Ansprüche 1 bis 4, kodierend für ein immunmodulatorisches T-Zell reaktives Fragment, dadurch gekennzeichnet, daß besagte Nukleotidsequenz durch gezielte Mutation einzelner Codons, Eliminierung oder Addition gezielt verändert wurde.
- 30 6. Ein DNA-Molekül gemäß Anspruch 5, dadurch gekennzeichnet, daß die besagte Mutation zum Austausch eines, mehrerer oder aller Cysteine des entsprechenden Polypeptids gegen eine andere Aminosäure führt.
- 35 7. Ein rekombinanter DNA-Expressionsvektor oder ein Klonierungssystem, enthaltend ein DNA-Molekül gemäß einem oder mehreren der Ansprü-

che 1 bis 6, funktionell verbunden mit einer Expressionskontrollsequenz.

- 5 8. Ein Wirtsorganismus, transformiert mit einem DNA-Molekül gemäß einem oder mehreren der Ansprüche 1 bis 6 oder einem Expressionsvektor gemäß Anspruch 7.
- 10 9. Ein Verfahren zur Herstellung eines Polypeptids, kodiert durch eine DNA-Sequenz gemäß einem oder mehreren der Ansprüche 1 bis 6, durch Kultivieren eines Wirtsorganismus gemäß Anspruch 8 und Gewinnung des entsprechenden Polypeptids aus der Kultur.
- 15 10. Ein Polypeptid, welches von einer DNA-Sequenz gemäß einem oder mehreren der Ansprüche 1 bis 6 kodiert wird.
11. Ein Polypeptid gemäß Anspruch 10 als Arzneimittel.
- 20 12. Eine pharmazeutische Zubereitung, enthaltend mindestens ein Polypeptid gemäß Anspruch 11 und gegebenenfalls weitere Wirk- und/oder Hilfsstoffe zur Diagnose und/oder Behandlung von Allergien, an deren Auslösung Gruppe-4-Allergene der *Poaceae* beteiligt sind.
- 25 13. Verwendung mindestens eines Polypeptids gemäß Anspruch 11 zur Herstellung eines Arzneimittels zur Diagnose und/oder Behandlung von Allergien, an deren Auslösung Gruppe-4-Allergene der *Poaceae* beteiligt sind und/oder zur Prävention solcher Allergien.
- 30 14. Ein DNA-Molekül gemäß einem oder mehreren der Ansprüche 1 bis 6 als Arzneimittel.

15. Ein rekombinanter Expressionsvektor gemäß Anspruch 7 als Arzneimittel.

5

16. Eine pharmazeutische Zubereitung, enthaltend mindestens ein DNA-Molekül gemäß Anspruch 14 oder mindestens einen Expressionsvektor gemäß Anspruch 15 und gegebenenfalls weitere Wirk- und/oder Hilfsstoffe zur immuntherapeutischen DNA-Vakzinierung von Patienten mit Allergien, an deren Auslösung Gruppe-4-Allergene der *Poaceae* beteiligt sind und/oder zur Prävention solcher Allergien.

10

15

17. Verwendung mindestens eines DNA-Moleküls gemäß Anspruch 14 oder mindestens eines Expressionsvektors gemäß Anspruch 15 zur Herstellung eines Arzneimittels zur immuntherapeutischen DNA-Vakzinierung von Patienten mit Allergien, an deren Auslösung Gruppe-4-Allergene der *Poaceae* beteiligt sind und/oder zur Prävention solcher Allergien.

20

25

30

35

Sequenz-Protokoll

<110> Merck Patent GmbH

<120> DNA-Sequenz und rekombinante Herstellung des Graspollen-Allergens
Lol p 4

<130> P 03/240

<140> DE 10359352.7

<141> 2003-12-16

<160> 27

<170> PatentIn version 3.1

<210> 1

<211> 1272

<212> DNA

<213> Lol p 4

<220>

<221> CDS

<222> (2)..(1270)

<223>

<400> 1

t gcc gtg gtg tgc ggc cgc cgt tac gac gtc cgc atc cgc gta cgc agc	49
Ala Val Val Cys Gly Arg Arg Tyr Asp Val Arg Ile Arg Val Arg Ser	
1 5 10 15	

ggc ggg cac gac tac gag ggc ctc tcg tac cgc tcc ctg cag ccc gag	97
Gly Gly His Asp Tyr Glu Gly Leu Ser Tyr Arg Ser Leu Gln Pro Glu	
20 25 30	

aac ttc gca gtc gtc gac ctc aac cag atg cgg gcg gtg ttg gtg gac	145
---	-----

- 2 -

Asn	Phe	Ala	Val	Val	Asp	Leu	Asn	Gln	Met	Arg	Ala	Val	Leu	Val	Asp		
		35					40					45					
ggt	aag	gcc	cgc	acg	gcg	tgg	gtc	gac	tcc	ggc	gcg	cag	ctc	ggc	gag		193
Gly	Lys	Ala	Arg	Thr	Ala	Trp	Val	Asp	Ser	Gly	Ala	Gln	Leu	Gly	Glu		
	50					55					60						
ctc	tac	tac	gcc	atc	tcc	aag	tat	agc	cgc	acg	ctg	gcc	ttc	ccg	gca		241
Leu	Tyr	Tyr	Ala	Ile	Ser	Lys	Tyr	Ser	Arg	Thr	Leu	Ala	Phe	Pro	Ala		
65					70					75					80		
ggc	gtt	tgc	ccg	acc	atc	ggc	gtg	ggc	ggc	aac	ctc	gcg	ggc	ggc	ggc		289
Gly	Val	Cys	Pro	Thr	Ile	Gly	Val	Gly	Gly	Asn	Leu	Ala	Gly	Gly	Gly		
				85					90					95			
ttc	ggt	atg	ctg	ctg	cgc	aag	tac	ggc	atc	gcc	gca	gag	aac	gtc	atc		337
Phe	Gly	Met	Leu	Leu	Arg	Lys	Tyr	Gly	Ile	Ala	Ala	Glu	Asn	Val	Ile		
			100					105					110				
gac	gtg	aag	ctc	gtc	gac	gcc	aac	ggc	aag	ctg	cac	gac	aag	aag	tcc		385
Asp	Val	Lys	Leu	Val	Asp	Ala	Asn	Gly	Lys	Leu	His	Asp	Lys	Lys	Ser		
		115					120					125					
atg	ggc	gac	gac	cat	ttc	tgg	gcc	gtg	agg	ggt	ggc	ggc	ggc	gag	agc		433
Met	Gly	Asp	Asp	His	Phe	Trp	Ala	Val	Arg	Gly	Gly	Gly	Gly	Glu	Ser		
	130					135					140						
ttc	ggc	atc	gtg	gtc	tgc	tgg	cag	gtg	aag	ctc	ctg	ccg	gtg	cct	ccc		481
Phe	Gly	Ile	Val	Val	Ser	Trp	Gln	Val	Lys	Leu	Leu	Pro	Val	Pro	Pro		
145					150					155					160		
acg	gtg	acc	atc	ttc	aag	atc	ccc	aag	tca	gtc	agc	gag	ggc	gcc	gtg		529
Thr	Val	Thr	Ile	Phe	Lys	Ile	Pro	Lys	Ser	Val	Ser	Glu	Gly	Ala	Val		
				165					170					175			
gac	atc	atc	aac	aag	tgg	caa	ctg	gtc	gcg	cct	caa	ctt	ccc	gcc	gac		577
Asp	Ile	Ile	Asn	Lys	Trp	Gln	Leu	Val	Ala	Pro	Gln	Leu	Pro	Ala	Asp		
			180					185					190				
ctc	atg	atc	cgc	atc	att	gcg	atg	ggg	ccc	aag	gcc	acg	ttc	gag	gcc		625
Leu	Met	Ile	Arg	Ile	Ile	Ala	Met	Gly	Pro	Lys	Ala	Thr	Phe	Glu	Ala		
		195					200					205					
atg	tac	ctc	ggc	acc	tgc	aaa	acc	ctg	acg	ccg	atg	atg	cag	agc	aag		673
Met	Tyr	Leu	Gly	Thr	Cys	Lys	Thr	Leu	Thr	Pro	Met	Met	Gln	Ser	Lys		
	210					215					220						
ttc	ccc	gag	ctt	ggc	atg	aac	gcc	tgc	cac	tgc	aac	gag	atg	tca	tgg		721
Phe	Pro	Glu	Leu	Gly	Met	Asn	Ala	Ser	His	Cys	Asn	Glu	Met	Ser	Trp		
225					230					235					240		
atc	gag	tcc	atc	ccc	ttc	gtc	cac	ctc	ggc	cat	agg	gat	tcc	ctg	gag		769
Ile	Glu	Ser	Ile	Pro	Phe	Val	His	Leu	Gly	His	Arg	Asp	Ser	Leu	Glu		
				245					250					255			
ggc	gac	ctc	ctc	aac	cgg	aac	aac	acc	ttc	aag	ccc	ttt	gcg	gag	tac		817
Gly	Asp	Leu	Leu	Asn	Arg	Asn	Asn	Thr	Phe	Lys	Pro	Phe	Ala	Glu	Tyr		
				260				265					270				
aaa	tgc	gac	tac	gtc	tac	gag	cca	ttc	ccc	aag	agc	gtg	tgg	gag	cag		865
Lys	Ser	Asp	Tyr	Val	Tyr	Glu	Pro	Phe	Pro	Lys	Ser	Val	Trp	Glu	Gln		
		275					280					285					

- 3 -

atc ttc ggc acc tgg ctc gtg aag cct ggt gcg ggg att atg atc ttt 913
 Ile Phe Gly Thr Trp Leu Val Lys Pro Gly Ala Gly Ile Met Ile Phe
 290 295 300

gac ccc tac ggt gcc acc atc agc gct acc cca gaa gcg gcg acg ccg 961
 Asp Pro Tyr Gly Ala Thr Ile Ser Ala Thr Pro Glu Ala Ala Thr Pro
 305 310 315 320

ttc cct cac cgc aag gga gtc ctc ttc aac atc cag tac gtc aac tac 1009
 Phe Pro His Arg Lys Gly Val Leu Phe Asn Ile Gln Tyr Val Asn Tyr
 325 330 335

tgg ttc gct ccg gga gcc ggc gcc gcg ccc ttg tca tgg agc aag gaa 1057
 Trp Phe Ala Pro Gly Ala Gly Ala Ala Pro Leu Ser Trp Ser Lys Glu
 340 345 350

atc tac aac tac atg gag ccg tac gtg agc aag aac ccc agg cag gcc 1105
 Ile Tyr Asn Tyr Met Glu Pro Tyr Val Ser Lys Asn Pro Arg Gln Ala
 355 360 365

tac gcc aac tac agg gac atc gac ctc ggg agg aac gag gtg gtg aat 1153
 Tyr Ala Asn Tyr Arg Asp Ile Asp Leu Gly Arg Asn Glu Val Val Asn
 370 375 380

ggc gtc tcc acc tac agc agt ggt aag gtc tgg gga cag aaa tat ttc 1201
 Gly Val Ser Thr Tyr Ser Ser Gly Lys Val Trp Gly Gln Lys Tyr Phe
 385 390 395 400

aag ggt aac ttc gag agg ctc gcc att acc aag ggc aag gtg gat cct 1249
 Lys Gly Asn Phe Glu Arg Leu Ala Ile Thr Lys Gly Lys Val Asp Pro
 405 410 415

acg gat tac ttc agg aac gag ca 1272
 Thr Asp Tyr Phe Arg Asn Glu
 420

<210> 2

<211> 423

<212> PRT

<213> Lol p 4

<400> 2

Ala Val Val Cys Gly Arg Arg Tyr Asp Val Arg Ile Arg Val Arg Ser
 1 5 10 15

Gly Gly His Asp Tyr Glu Gly Leu Ser Tyr Arg Ser Leu Gln Pro Glu
 20 25 30

Asn Phe Ala Val Val Asp Leu Asn Gln Met Arg Ala Val Leu Val Asp
 35 40 45

- 4 -

Gly Lys Ala Arg Thr Ala Trp Val Asp Ser Gly Ala Gln Leu Gly Glu
50 55 60

Leu Tyr Tyr Ala Ile Ser Lys Tyr Ser Arg Thr Leu Ala Phe Pro Ala
65 70 75 80

Gly Val Cys Pro Thr Ile Gly Val Gly Gly Asn Leu Ala Gly Gly Gly
85 90 95

Phe Gly Met Leu Leu Arg Lys Tyr Gly Ile Ala Ala Glu Asn Val Ile
100 105 110

Asp Val Lys Leu Val Asp Ala Asn Gly Lys Leu His Asp Lys Lys Ser
115 120 125

Met Gly Asp Asp His Phe Trp Ala Val Arg Gly Gly Gly Gly Glu Ser
130 135 140

Phe Gly Ile Val Val Ser Trp Gln Val Lys Leu Leu Pro Val Pro Pro
145 150 155 160

Thr Val Thr Ile Phe Lys Ile Pro Lys Ser Val Ser Glu Gly Ala Val
165 170 175

Asp Ile Ile Asn Lys Trp Gln Leu Val Ala Pro Gln Leu Pro Ala Asp
180 185 190

Leu Met Ile Arg Ile Ile Ala Met Gly Pro Lys Ala Thr Phe Glu Ala
195 200 205

Met Tyr Leu Gly Thr Cys Lys Thr Leu Thr Pro Met Met Gln Ser Lys
210 215 220

Phe Pro Glu Leu Gly Met Asn Ala Ser His Cys Asn Glu Met Ser Trp
225 230 235 240

Ile Glu Ser Ile Pro Phe Val His Leu Gly His Arg Asp Ser Leu Glu
245 250 255

Gly Asp Leu Leu Asn Arg Asn Asn Thr Phe Lys Pro Phe Ala Glu Tyr
260 265 270

Lys Ser Asp Tyr Val Tyr Glu Pro Phe Pro Lys Ser Val Trp Glu Gln
275 280 285

Ile Phe Gly Thr Trp Leu Val Lys Pro Gly Ala Gly Ile Met Ile Phe
290 295 300

- 5 -

Asp Pro Tyr Gly Ala Thr Ile Ser Ala Thr Pro Glu Ala Ala Thr Pro
305 310 315 320

Phe Pro His Arg Lys Gly Val Leu Phe Asn Ile Gln Tyr Val Asn Tyr
325 330 335

Trp Phe Ala Pro Gly Ala Gly Ala Ala Pro Leu Ser Trp Ser Lys Glu
340 345 350

Ile Tyr Asn Tyr Met Glu Pro Tyr Val Ser Lys Asn Pro Arg Gln Ala
355 360 365

Tyr Ala Asn Tyr Arg Asp Ile Asp Leu Gly Arg Asn Glu Val Val Asn
370 375 380

Gly Val Ser Thr Tyr Ser Ser Gly Lys Val Trp Gly Gln Lys Tyr Phe
385 390 395 400

Lys Gly Asn Phe Glu Arg Leu Ala Ile Thr Lys Gly Lys Val Asp Pro
405 410 415

Thr Asp Tyr Phe Arg Asn Glu
420

<210> 3

<211> 1503

<212> DNA

<213> Lol p 4

<220>

<221> CDS

<222> (1)..(1503)

<223>

<400> 3

tac ttc ccg ccg ccg gct gct aaa gaa gac ttc ctg ggt tgc ctg gtt 48
Tyr Phe Pro Pro Pro Ala Ala Lys Glu Asp Phe Leu Gly Cys Leu Val
1 5 10 15

aaa gaa atc ccg ccg cgt ctg ttg tac gcg aaa tcg tcg ccg gcg tat 96
Lys Glu Ile Pro Pro Arg Leu Leu Tyr Ala Lys Ser Ser Pro Ala Tyr
20 25 30

ccc tca gtc ctg ggg cag acc atc cgg aac tcg agg tgg tgg tgg ccg	144
Pro Ser Val Leu Gly Gln Thr Ile Arg Asn Ser Arg Trp Ser Ser Pro	
35 40 45	
gac aac gtg aag ccg ctc tac atc atc acc ccc acc aac gtc tcc cac	192
Asp Asn Val Lys Pro Leu Tyr Ile Ile Thr Pro Thr Asn Val Ser His	
50 55 60	
atc cag tct gcc gtg gtg tgc ggc cgc cgt tac gac gtc cgc atc cgc	240
Ile Gln Ser Ala Val Val Cys Gly Arg Arg Tyr Asp Val Arg Ile Arg	
65 70 75 80	
gta cgc agc ggc ggg cac gac tac gag ggc ctc tcg tac cgc tcc ctg	288
Val Arg Ser Gly Gly His Asp Tyr Glu Gly Leu Ser Tyr Arg Ser Leu	
85 90 95	
cag ccc gag aac ttc gca gtc gtc gac ctc aac cag atg cgg gcg gtg	336
Gln Pro Glu Asn Phe Ala Val Val Asp Leu Asn Gln Met Arg Ala Val	
100 105 110	
ttg gtg gac ggt aag gcc cgc acg gcg tgg gtc gac tcc ggc gcg cag	384
Leu Val Asp Gly Lys Ala Arg Thr Ala Trp Val Asp Ser Gly Ala Gln	
115 120 125	
ctc ggc gag ctc tac tac gcc atc tcc aag tat agc cgc acg ctg gcc	432
Leu Gly Glu Leu Tyr Tyr Ala Ile Ser Lys Tyr Ser Arg Thr Leu Ala	
130 135 140	
ttc ccg gca ggc gtt tgc ccg acc atc ggc gtg ggc ggc aac ctc gcg	480
Phe Pro Ala Gly Val Cys Pro Thr Ile Gly Val Gly Gly Asn Leu Ala	
145 150 155 160	
ggc ggc ggc ttc ggt atg ctg ctg cgc aag tac ggc atc gcc gca gag	528
Gly Gly Gly Phe Gly Met Leu Leu Arg Lys Tyr Gly Ile Ala Ala Glu	
165 170 175	
aac gtc atc gac gtg aag ctc gtc gac gcc aac ggc aag ctg cac gac	576
Asn Val Ile Asp Val Lys Leu Val Asp Ala Asn Gly Lys Leu His Asp	
180 185 190	
aag aag tcc atg ggc gac gac cat ttc tgg gcc gtg agg ggt ggc ggc	624
Lys Lys Ser Met Gly Asp Asp His Phe Trp Ala Val Arg Gly Gly Gly	
195 200 205	
ggc gag agc ttc ggc atc gtg gtc tcg tgg cag gtg aag ctc ctg ccg	672
Gly Glu Ser Phe Gly Ile Val Val Ser Trp Gln Val Lys Leu Leu Pro	
210 215 220	
gtg cct ccc acg gtg acc atc ttc aag atc ccc aag tca gtc agc gag	720
Val Pro Pro Thr Val Thr Ile Phe Lys Ile Pro Lys Ser Val Ser Glu	
225 230 235 240	
ggc gcc gtg gac atc atc aac aag tgg caa ctg gtc gcg cct caa ctt	768
Gly Ala Val Asp Ile Ile Asn Lys Trp Gln Leu Val Ala Pro Gln Leu	
245 250 255	
ccc gcc gac ctc atg atc cgc atc att gcg atg ggc ccc aag gcc acg	816
Pro Ala Asp Leu Met Ile Arg Ile Ile Ala Met Gly Pro Lys Ala Thr	
260 265 270	
ttc gag gcc atg tac ctc ggc acc tgc aaa acc ctg acg ccg atg atg	864

- 7 -

Phe	Glu	Ala	Met	Tyr	Leu	Gly	Thr	Cys	Lys	Thr	Leu	Thr	Pro	Met	Met		
		275					280					285					
cag	agc	aag	ttc	ccc	gag	ctt	ggc	atg	aac	gcc	tcg	cac	tgc	aac	gag	912	
Gln	Ser	Lys	Phe	Pro	Glu	Leu	Gly	Met	Asn	Ala	Ser	His	Cys	Asn	Glu		
		290				295					300						
atg	tca	tgg	atc	gag	tcc	atc	ccc	ttc	gtc	cac	ctc	ggc	cat	agg	gat	960	
Met	Ser	Trp	Ile	Glu	Ser	Ile	Pro	Phe	Val	His	Leu	Gly	His	Arg	Asp		
305					310					315					320		
tcc	ctg	gag	ggc	gac	ctc	ctc	aac	cgg	aac	aac	acc	ttc	aag	ccc	ttt	1008	
Ser	Leu	Glu	Gly	Asp	Leu	Leu	Asn	Arg	Asn	Asn	Thr	Phe	Lys	Pro	Phe		
				325					330					335			
gcg	gag	tac	aaa	tcg	gac	tac	gtc	tac	gag	cca	ttc	ccc	aag	agc	gtg	1056	
Ala	Glu	Tyr	Lys	Ser	Asp	Tyr	Val	Tyr	Glu	Pro	Phe	Pro	Lys	Ser	Val		
			340				345						350				
tgg	gag	cag	atc	ttc	ggc	acc	tgg	ctc	gtg	aag	cct	ggt	gcg	ggg	att	1104	
Trp	Glu	Gln	Ile	Phe	Gly	Thr	Trp	Leu	Val	Lys	Pro	Gly	Ala	Gly	Ile		
		355					360					365					
atg	atc	ttt	gac	ccc	tac	ggt	gcc	acc	atc	agc	gct	acc	cca	gaa	gcg	1152	
Met	Ile	Phe	Asp	Pro	Tyr	Gly	Ala	Thr	Ile	Ser	Ala	Thr	Pro	Glu	Ala		
		370				375					380						
gcg	acg	ccg	ttc	cct	cac	cgc	aag	gga	gtc	ctc	ttc	aac	atc	cag	tac	1200	
Ala	Thr	Pro	Phe	Pro	His	Arg	Lys	Gly	Val	Leu	Phe	Asn	Ile	Gln	Tyr		
385					390					395				400			
gtc	aac	tac	tgg	ttc	gct	ccg	gga	gcc	ggc	gcc	gcg	ccc	ttg	tca	tgg	1248	
Val	Asn	Tyr	Trp	Phe	Ala	Pro	Gly	Ala	Gly	Ala	Ala	Pro	Leu	Ser	Trp		
				405					410					415			
agc	aag	gaa	atc	tac	aac	tac	atg	gag	ccg	tac	gtg	agc	aag	aac	ccc	1296	
Ser	Lys	Glu	Ile	Tyr	Asn	Tyr	Met	Glu	Pro	Tyr	Val	Ser	Lys	Asn	Pro		
			420				425						430				
agg	cag	gcc	tac	gcc	aac	tac	agg	gac	atc	gac	ctc	ggg	agg	aac	gag	1344	
Arg	Gln	Ala	Tyr	Ala	Asn	Tyr	Arg	Asp	Ile	Asp	Leu	Gly	Arg	Asn	Glu		
		435					440					445					
gtg	gtg	aat	ggc	gtc	tcc	acc	tac	agc	agt	ggt	aag	gtc	tgg	gga	cag	1392	
Val	Val	Asn	Gly	Val	Ser	Thr	Tyr	Ser	Ser	Gly	Lys	Val	Trp	Gly	Gln		
		450				455					460						
aaa	tat	ttc	aag	ggt	aac	ttc	gag	agg	ctc	gcc	att	acc	aag	ggc	aag	1440	
Lys	Tyr	Phe	Lys	Gly	Asn	Phe	Glu	Arg	Leu	Ala	Ile	Thr	Lys	Gly	Lys		
		465			470					475					480		
gtg	gat	cct	acg	gat	tac	ttc	agg	aac	gag	cag	agc	atc	ccg	ccg	ctc	1488	
Val	Asp	Pro	Thr	Asp	Tyr	Phe	Arg	Asn	Glu	Gln	Ser	Ile	Pro	Pro	Leu		
				485					490					495			
atc	aaa	aag	tac	tga												1503	
Ile	Lys	Lys	Tyr														
			500														

- 8 -

<211> 500

<212> PRT

<213> Lol p 4

<400> 4

Tyr Phe Pro Pro Pro Ala Ala Lys Glu Asp Phe Leu Gly Cys Leu Val
1 5 10 15

Lys Glu Ile Pro Pro Arg Leu Leu Tyr Ala Lys Ser Ser Pro Ala Tyr
20 25 30

Pro Ser Val Leu Gly Gln Thr Ile Arg Asn Ser Arg Trp Ser Ser Pro
35 40 45

Asp Asn Val Lys Pro Leu Tyr Ile Ile Thr Pro Thr Asn Val Ser His
50 55 60

Ile Gln Ser Ala Val Val Cys Gly Arg Arg Tyr Asp Val Arg Ile Arg
65 70 75 80

Val Arg Ser Gly Gly His Asp Tyr Glu Gly Leu Ser Tyr Arg Ser Leu
85 90 95

Gln Pro Glu Asn Phe Ala Val Val Asp Leu Asn Gln Met Arg Ala Val
100 105 110

Leu Val Asp Gly Lys Ala Arg Thr Ala Trp Val Asp Ser Gly Ala Gln
115 120 125

Leu Gly Glu Leu Tyr Tyr Ala Ile Ser Lys Tyr Ser Arg Thr Leu Ala
130 135 140

Phe Pro Ala Gly Val Cys Pro Thr Ile Gly Val Gly Gly Asn Leu Ala
145 150 155 160

Gly Gly Gly Phe Gly Met Leu Leu Arg Lys Tyr Gly Ile Ala Ala Glu
165 170 175

Asn Val Ile Asp Val Lys Leu Val Asp Ala Asn Gly Lys Leu His Asp
180 185 190

Lys Lys Ser Met Gly Asp Asp His Phe Trp Ala Val Arg Gly Gly Gly
195 200 205

- 9 -

Gly Glu Ser Phe Gly Ile Val Val Ser Trp Gln Val Lys Leu Leu Pro
 210 215 220

Val Pro Pro Thr Val Thr Ile Phe Lys Ile Pro Lys Ser Val Ser Glu
 225 230 235 240

Gly Ala Val Asp Ile Ile Asn Lys Trp Gln Leu Val Ala Pro Gln Leu
 245 250 255

Pro Ala Asp Leu Met Ile Arg Ile Ile Ala Met Gly Pro Lys Ala Thr
 260 265 270

Phe Glu Ala Met Tyr Leu Gly Thr Cys Lys Thr Leu Thr Pro Met Met
 275 280 285

Gln Ser Lys Phe Pro Glu Leu Gly Met Asn Ala Ser His Cys Asn Glu
 290 295 300

Met Ser Trp Ile Glu Ser Ile Pro Phe Val His Leu Gly His Arg Asp
 305 310 315 320

Ser Leu Glu Gly Asp Leu Leu Asn Arg Asn Asn Thr Phe Lys Pro Phe
 325 330 335

Ala Glu Tyr Lys Ser Asp Tyr Val Tyr Glu Pro Phe Pro Lys Ser Val
 340 345 350

Trp Glu Gln Ile Phe Gly Thr Trp Leu Val Lys Pro Gly Ala Gly Ile
 355 360 365

Met Ile Phe Asp Pro Tyr Gly Ala Thr Ile Ser Ala Thr Pro Glu Ala
 370 375 380

Ala Thr Pro Phe Pro His Arg Lys Gly Val Leu Phe Asn Ile Gln Tyr
 385 390 395 400

Val Asn Tyr Trp Phe Ala Pro Gly Ala Gly Ala Ala Pro Leu Ser Trp
 405 410 415

Ser Lys Glu Ile Tyr Asn Tyr Met Glu Pro Tyr Val Ser Lys Asn Pro
 420 425 430

Arg Gln Ala Tyr Ala Asn Tyr Arg Asp Ile Asp Leu Gly Arg Asn Glu
 435 440 445

Val Val Asn Gly Val Ser Thr Tyr Ser Ser Gly Lys Val Trp Gly Gln
 450 455 460

- 10 -

Lys Tyr Phe Lys Gly Asn Phe Glu Arg Leu Ala Ile Thr Lys Gly Lys
 465 470 475 480

Val Asp Pro Thr Asp Tyr Phe Arg Asn Glu Gln Ser Ile Pro Pro Leu
 485 490 495

Ile Lys Lys Tyr
 500

<210> 5

<211> 1503

<212> DNA

<213> Ph1 p 4

<220>

<221> CDS

<222> (1)..(1503)

<223>

<400> 5

tac ttc ccg ccg ccg gct gct aaa gaa gac ttc ctg ggt tgc ctg gtt 48
 Tyr Phe Pro Pro Pro Ala Ala Lys Glu Asp Phe Leu Gly Cys Leu Val
 1 5 10 15

aaa gaa atc ccg ccg cgt ctg ttg tac gcg aaa tcg tcg ccg gcg tat 96
 Lys Glu Ile Pro Pro Arg Leu Leu Tyr Ala Lys Ser Ser Pro Ala Tyr
 20 25 30

ccc tca gtc ctg ggg cag acc atc ccg aac tcg agg tgg tcg tcg ccg 144
 Pro Ser Val Leu Gly Gln Thr Ile Arg Asn Ser Arg Trp Ser Ser Pro
 35 40 45

gac aac gtg aag ccg ctc tac atc atc acc ccc acc aac gtc tcc cac 192
 Asp Asn Val Lys Pro Leu Tyr Ile Ile Thr Pro Thr Asn Val Ser His
 50 55 60

atc cag tcc gcc gtg gtg tgc ggc cgc cgc cac agc gtc cgc atc cgc 240
 Ile Gln Ser Ala Val Val Cys Gly Arg Arg His Ser Val Arg Ile Arg
 65 70 75 80

gtg cgc agc ggc ggg cac gac tac gag ggc ctc tcg tac ccg tct ttg 288
 Val Arg Ser Gly Gly His Asp Tyr Glu Gly Leu Ser Tyr Arg Ser Leu
 85 90 95

cag ccc gag acg ttc gcc gtc gtc gac ctc aac aag atg ccg gcg gtg 336
 Gln Pro Glu Thr Phe Ala Val Val Asp Leu Asn Lys Met Arg Ala Val
 100 105 110

tgg	gtg	gac	ggc	aag	gcc	cgc	acg	gcg	tgg	gtg	gac	tcc	ggc	gcg	cag	384
Trp	Val	Asp	Gly	Lys	Ala	Arg	Thr	Ala	Trp	Val	Asp	Ser	Gly	Ala	Gln	
		115					120					125				
ctc	ggc	gag	ctc	tac	tac	gcc	atc	tat	aag	gcg	agc	ccc	acg	ctg	gcg	432
Leu	Gly	Glu	Leu	Tyr	Tyr	Ala	Ile	Tyr	Lys	Ala	Ser	Pro	Thr	Leu	Ala	
	130					135					140					
ttc	ccg	gcc	ggc	gtg	tgc	ccg	acg	atc	gga	gtg	ggc	ggc	aac	ttc	gcg	480
Phe	Pro	Ala	Gly	Val	Cys	Pro	Thr	Ile	Gly	Val	Gly	Gly	Asn	Phe	Ala	
145					150					155					160	
ggc	ggc	ggc	ttc	ggc	atg	ctg	ctg	cgc	aag	tac	ggc	atc	gcc	gcg	gag	528
Gly	Gly	Gly	Phe	Gly	Met	Leu	Leu	Arg	Lys	Tyr	Gly	Ile	Ala	Ala	Glu	
				165					170					175		
aac	gtc	atc	gac	gtg	aag	ctc	gtc	gac	gcc	aac	ggc	aag	ctg	cac	gac	576
Asn	Val	Ile	Asp	Val	Lys	Leu	Val	Asp	Ala	Asn	Gly	Lys	Leu	His	Asp	
			180					185					190			
aag	aag	tcc	atg	ggc	gac	gac	cat	ttc	tgg	gcc	gtc	agg	ggc	ggc	ggg	624
Lys	Lys	Ser	Met	Gly	Asp	Asp	His	Phe	Trp	Ala	Val	Arg	Gly	Gly	Gly	
		195					200					205				
ggc	gag	agc	ttc	ggc	atc	gtg	gtc	gcg	tgg	cag	gtg	aag	ctc	ctg	ccg	672
Gly	Glu	Ser	Phe	Gly	Ile	Val	Val	Ala	Trp	Gln	Val	Lys	Leu	Leu	Pro	
	210					215					220					
gtg	cog	ccc	acc	gtg	aca	ata	ttc	aag	atc	tcc	aag	aca	gtg	agc	gag	720
Val	Pro	Pro	Thr	Val	Thr	Ile	Phe	Lys	Ile	Ser	Lys	Thr	Val	Ser	Glu	
225					230					235					240	
ggc	gcc	gtg	gac	atc	atc	aac	aag	tgg	caa	gtg	gtc	gcg	ccg	cag	ctt	768
Gly	Ala	Val	Asp	Ile	Ile	Asn	Lys	Trp	Gln	Val	Val	Ala	Pro	Gln	Leu	
				245					250					255		
ccc	gcc	gac	ctc	atg	atc	cgc	atc	atc	gcg	cag	ggg	ccc	aag	gcc	acg	816
Pro	Ala	Asp	Leu	Met	Ile	Arg	Ile	Ile	Ala	Gln	Gly	Pro	Lys	Ala	Thr	
			260					265					270			
ttc	gag	gcc	atg	tac	ctc	ggc	acc	tgc	aaa	acc	ctg	acg	ccg	ttg	atg	864
Phe	Glu	Ala	Met	Tyr	Leu	Gly	Thr	Cys	Lys	Thr	Leu	Thr	Pro	Leu	Met	
		275					280					285				
agc	agc	aag	ttc	ccg	gag	ctc	ggc	atg	aac	ccc	tcc	cac	tgc	aac	gag	912
Ser	Ser	Lys	Phe	Pro	Glu	Leu	Gly	Met	Asn	Pro	Ser	His	Cys	Asn	Glu	
		290				295					300					
atg	tca	tgg	atc	cag	tcc	atc	ccc	ttc	gtc	cac	ctc	ggc	cac	agg	gac	960
Met	Ser	Trp	Ile	Gln	Ser	Ile	Pro	Phe	Val	His	Leu	Gly	His	Arg	Asp	
305					310					315					320	
gcc	ctc	gag	gac	gac	ctc	ctc	aac	cgg	aac	aac	tcc	ttc	aag	ccc	ttc	1008
Ala	Leu	Glu	Asp	Asp	Leu	Leu	Asn	Arg	Asn	Asn	Ser	Phe	Lys	Pro	Phe	
				325					330					335		
gcc	gaa	tac	aag	tcc	gac	tac	gtc	tac	cag	ccc	ttc	ccc	aag	acc	gtc	1056
Ala	Glu	Tyr	Lys	Ser	Asp	Tyr	Val	Tyr	Gln	Pro	Phe	Pro	Lys	Thr	Val	
			340					345					350			
tgg	gag	cag	atc	ctc	aac	acc	tgg	ctc	gtc	aag	ccc	ggc	gcc	ggg	atc	1104

- 12 -

Trp Glu Gln Ile Leu Asn Thr Trp Leu Val Lys Pro Gly Ala Gly Ile
 355 360 365
 atg atc ttc gac ccc tac ggc gcc acc atc agc gcc acc ccg gag tcc 1152
 Met Ile Phe Asp Pro Tyr Gly Ala Thr Ile Ser Ala Thr Pro Glu Ser
 370 375 380
 gcc acg ccc ttc cct cac cgc aag ggc gtc ctc ttc aac atc cag tac 1200
 Ala Thr Pro Phe Pro His Arg Lys Gly Val Leu Phe Asn Ile Gln Tyr
 385 390 395 400
 gtc aac tac tgg ttc gcc ccg gga gcc gcc gcc gcg ccc ctc tcg tgg 1248
 Val Asn Tyr Trp Phe Ala Pro Gly Ala Ala Ala Ala Pro Leu Ser Trp
 405 410 415
 agc aag gac atc tac aac tac atg gag ccc tac gtg agc aag aac ccc 1296
 Ser Lys Asp Ile Tyr Asn Tyr Met Glu Pro Tyr Val Ser Lys Asn Pro
 420 425 430
 agg cag gcg tac gca aac tac agg gac atc gac ctc ggc agg aac gag 1344
 Arg Gln Ala Tyr Ala Asn Tyr Arg Asp Ile Asp Leu Gly Arg Asn Glu
 435 440 445
 gtg gtc aac gac gtc tcc acc tac gcc agc ggc aag gtc tgg ggc cag 1392
 Val Val Asn Asp Val Ser Thr Tyr Ala Ser Gly Lys Val Trp Gly Gln
 450 455 460
 aaa tac ttc aag ggc aac ttc gag agg ctc gcc att acc aag ggc aag 1440
 Lys Tyr Phe Lys Gly Asn Phe Glu Arg Leu Ala Ile Thr Lys Gly Lys
 465 470 475 480
 gtc gat cct acc gac tac ttc agg aac gag cag agc atc ccg ccg ctc 1488
 Val Asp Pro Thr Asp Tyr Phe Arg Asn Glu Gln Ser Ile Pro Pro Leu
 485 490 495
 atc aaa aag tac tga 1503
 Ile Lys Lys Tyr
 500

<210> 6

<211> 500

<212> PRT

<213> Ph1 p 4

<400> 6

Tyr Phe Pro Pro Pro Ala Ala Lys Glu Asp Phe Leu Gly Cys Leu Val
 1 5 10 15
 Lys Glu Ile Pro Pro Arg Leu Leu Tyr Ala Lys Ser Ser Pro Ala Tyr
 20 25 30
 Pro Ser Val Leu Gly Gln Thr Ile Arg Asn Ser Arg Trp Ser Ser Pro
 35 40 45

Asp Asn Val Lys Pro Leu Tyr Ile Ile Thr Pro Thr Asn Val Ser His
 50 55 60

Ile Gln Ser Ala Val Val Cys Gly Arg Arg His Ser Val Arg Ile Arg
 65 70 75 80

Val Arg Ser Gly Gly His Asp Tyr Glu Gly Leu Ser Tyr Arg Ser Leu
 85 90 95

Gln Pro Glu Thr Phe Ala Val Val Asp Leu Asn Lys Met Arg Ala Val
 100 105 110

Trp Val Asp Gly Lys Ala Arg Thr Ala Trp Val Asp Ser Gly Ala Gln
 115 120 125

Leu Gly Glu Leu Tyr Tyr Ala Ile Tyr Lys Ala Ser Pro Thr Leu Ala
 130 135 140

Phe Pro Ala Gly Val Cys Pro Thr Ile Gly Val Gly Gly Asn Phe Ala
 145 150 155 160

Gly Gly Gly Phe Gly Met Leu Leu Arg Lys Tyr Gly Ile Ala Ala Glu
 165 170 175

Asn Val Ile Asp Val Lys Leu Val Asp Ala Asn Gly Lys Leu His Asp
 180 185 190

Lys Lys Ser Met Gly Asp Asp His Phe Trp Ala Val Arg Gly Gly Gly
 195 200 205

Gly Glu Ser Phe Gly Ile Val Val Ala Trp Gln Val Lys Leu Leu Pro
 210 215 220

Val Pro Pro Thr Val Thr Ile Phe Lys Ile Ser Lys Thr Val Ser Glu
 225 230 235 240

Gly Ala Val Asp Ile Ile Asn Lys Trp Gln Val Val Ala Pro Gln Leu
 245 250 255

Pro Ala Asp Leu Met Ile Arg Ile Ile Ala Gln Gly Pro Lys Ala Thr
 260 265 270

Phe Glu Ala Met Tyr Leu Gly Thr Cys Lys Thr Leu Thr Pro Leu Met
 275 280 285

- 14 -

Ser Ser Lys Phe Pro Glu Leu Gly Met Asn Pro Ser His Cys Asn Glu
 290 295 300

Met Ser Trp Ile Gln Ser Ile Pro Phe Val His Leu Gly His Arg Asp
 305 310 315 320

Ala Leu Glu Asp Asp Leu Leu Asn Arg Asn Asn Ser Phe Lys Pro Phe
 325 330 335

Ala Glu Tyr Lys Ser Asp Tyr Val Tyr Gln Pro Phe Pro Lys Thr Val
 340 345 350

Trp Glu Gln Ile Leu Asn Thr Trp Leu Val Lys Pro Gly Ala Gly Ile
 355 360 365

Met Ile Phe Asp Pro Tyr Gly Ala Thr Ile Ser Ala Thr Pro Glu Ser
 370 375 380

Ala Thr Pro Phe Pro His Arg Lys Gly Val Leu Phe Asn Ile Gln Tyr
 385 390 395 400

Val Asn Tyr Trp Phe Ala Pro Gly Ala Ala Ala Ala Pro Leu Ser Trp
 405 410 415

Ser Lys Asp Ile Tyr Asn Tyr Met Glu Pro Tyr Val Ser Lys Asn Pro
 420 425 430

Arg Gln Ala Tyr Ala Asn Tyr Arg Asp Ile Asp Leu Gly Arg Asn Glu
 435 440 445

Val Val Asn Asp Val Ser Thr Tyr Ala Ser Gly Lys Val Trp Gly Gln
 450 455 460

Lys Tyr Phe Lys Gly Asn Phe Glu Arg Leu Ala Ile Thr Lys Gly Lys
 465 470 475 480

Val Asp Pro Thr Asp Tyr Phe Arg Asn Glu Gln Ser Ile Pro Pro Leu
 485 490 495

Ile Lys Lys Tyr
 500

<210> 7

<211> 12

<212> PRT

- 15 -

<213> Dactylus glomerata

<400> 7

Asp	Ile	Tyr	Asn	Tyr	Met	Glu	Pro	Tyr	Val	Ser	Lys
1				5					10		

<210> 8

<211> 11

<212> PRT

<213> Dactylus glomerata

<400> 8

Val	Asp	Pro	Thr	Asp	Tyr	Phe	Gly	Asn	Glu	Gln
1				5					10	

<210> 9

<211> 17

<212> PRT

<213> Dactylus glomerata

<400> 9

Ala	Arg	Thr	Ala	Trp	Val	Asp	Ser	Gly	Ala	Gln	Leu	Gly	Glu	Leu	Ser
1				5					10					15	

Tyr

<210> 10

<211> 15

<212> PRT

<213> Dactylus glomerata

<400> 10

Gly	Val	Leu	Phe	Asn	Ile	Gln	Tyr	Val	Asn	Tyr	Trp	Phe	Ala	Pro
1				5					10					15

- 16 -

<210> 11

<211> 11

<212> PRT

<213> Cynodon dactylon

<400> 11

Lys	Thr	Val	Lys	Pro	Leu	Tyr	Ile	Ile	Thr	Pro
1				5					10	

<210> 12

<211> 22

<212> PRT

<213> Cynodon dactylon

<400> 12

Lys	Gln	Val	Glu	Arg	Asp	Phe	Leu	Thr	Ser	Leu	Thr	Lys	Asp	Ile	Pro
1				5					10					15	

Gln	Leu	Tyr	Leu	Lys	Ser
			20		

<210> 13

<211> 16

<212> PRT

<213> Cynodon dactylon

<400> 13

Thr	Val	Lys	Pro	Leu	Tyr	Ile	Ile	Thr	Pro	Ile	Thr	Ala	Ala	Met	Ile
1				5					10					15	

<210> 14

<211> 24

<212> PRT

<213> Cynodon dactylon

- 17 -

<400> 14

Leu Arg Lys Tyr Gly Thr Ala Ala Asp Asn Val Ile Asp Ala Lys Val
1 5 10 15

Val Asp Ala Gln Gly Arg Leu Leu
20

<210> 15

<211> 14

<212> PRT

<213> Cynodon dactylon

<400> 15

Lys Trp Gln Thr Val Ala Pro Ala Leu Pro Asp Pro Asn Met
1 5 10

<210> 16

<211> 15

<212> PRT

<213> Cynodon dactylon

<400> 16

Val Thr Trp Ile Glu Ser Val Pro Tyr Ile Pro Met Gly Asp Lys
1 5 10 15

<210> 17

<211> 19

<212> PRT

<213> Cynodon dactylon

<220>

<221> MISC_FEATURE

<222> (8)..(8)

<223> undetermined amino acid

- 18 -

<400> 17

Gly	Thr	Val	Arg	Asp	Leu	Leu	Xaa	Arg	Thr	Ser	Asn	Ile	Lys	Ala	Phe
1				5					10					15	

Gly Lys Tyr

<210> 18

<211> 23

<212> PRT

<213> Cynodon dactylon

<400> 18

Thr	Ser	Asn	Ile	Lys	Ala	Phe	Gly	Lys	Tyr	Lys	Ser	Asp	Tyr	Val	Leu
1				5					10					15	

Glu	Pro	Ile	Pro	Lys	Lys	Ser
			20			

<210> 19

<211> 13

<212> PRT

<213> Cynodon dactylon

<400> 19

Tyr	Arg	Asp	Leu	Asp	Leu	Gly	Val	Asn	Gln	Val	Val	Gly
1				5					10			

<210> 20

<211> 15

<212> PRT

<213> Cynodon dactylon

<400> 20

Ser	Ala	Thr	Pro	Pro	Thr	His	Arg	Ser	Gly	Val	Leu	Phe	Asn	Ile
1				5					10					15

- 19 -

<210> 21

<211> 36

<212> PRT

<213> Cynodon dactylon

<400> 21

Ala	Ala	Ala	Ala	Leu	Pro	Thr	Gln	Val	Thr	Arg	Asp	Ile	Tyr	Ala	Phe
1				5					10					15	

Met	Thr	Pro	Tyr	Val	Ser	Lys	Asn	Pro	Arg	Gln	Ala	Tyr	Val	Asn	Tyr
			20					25					30		

Arg	Asp	Leu	Asp
		35	

<210> 22

<211> 14

<212> PRT

<213> Lolium perenne

<400> 22

Phe	Leu	Glu	Pro	Val	Leu	Gly	Leu	Ile	Phe	Pro	Ala	Gly	Val
1				5					10				

<210> 23

<211> 9

<212> PRT

<213> Lolium perenne

<400> 23

Gly	Leu	Ile	Glu	Phe	Pro	Ala	Gly	Val
1				5				

<210> 24

<211> 22

<212> DNA

- 20 -

<213> Lolium perenne

<400> 24
ggctcccggg gcgaaccagt ag 22

<210> 25

<211> 23

<212> DNA

<213> Lolium perenne

<400> 25
accaacgcct cccacatcca gtc 23

<210> 26

<211> 49

<212> DNA

<213> Lolium perenne

<400> 26
gataagcttg aattctgatt agtacttttt gatcagcggc gggatgctc 49

<210> 27

<211> 49

<212> DNA

<213> Lolium perenne

<400> 27
gataagcttc tcgagtgatt agtacttttt gatcagcggc gggatgctc 49